

「脳神経回路の形成・動作原理の解明と制御技術の創出」  
平成21年度採択研究代表者

H24 年度 実績報告
----------------

古川 貴久

大阪大学蛋白質研究所・教授

網膜神経回路のシナプス形成と生理機能発現の解析

## §1. 研究実施体制

### (1) 古川グループ

- ① 研究代表者: 古川 貴久 (大阪大学蛋白質研究所、教授)
- ② 研究項目
  - 1) 網膜におけるシナプス形成の分子基盤解明
  - 2) 網膜組織培養系を用いた新規なシナプス形成因子のスクリーニング
  - 3) 網膜神経回路の解析

### (2) 立花グループ

- ① 主たる共同研究者: 立花 政夫 (東京大学大学院人文社会系研究科、教授)
- ② 研究項目
  - 網膜神経回路の電気生理学的解析
  - 1) 動きを検出する神経回路網の解析
  - 2) 双極細胞への抑制性入力 of 機能解析

## §2. 研究実施内容

本研究は、中枢神経系のモデルとして網膜に注目し、「シナプスの特異的結合の分子メカニズム」および「網膜神経回路の生理機能と動作メカニズム」を解明することを目的としている。網膜神経回路構築の分子レベルでの理解を進めると同時に、遺伝子組み換えマウスを用いて電気生理学的解析や視覚行動解析を行い、網膜神経回路がどのようなメカニズムと機能原理に基づき視覚情報処理を行っているかを明らかにすることを旨とし、本年度は以下の研究を実施した。

### 古川グループ

(1) 研究題目: 網膜におけるシナプス形成の分子基盤解明

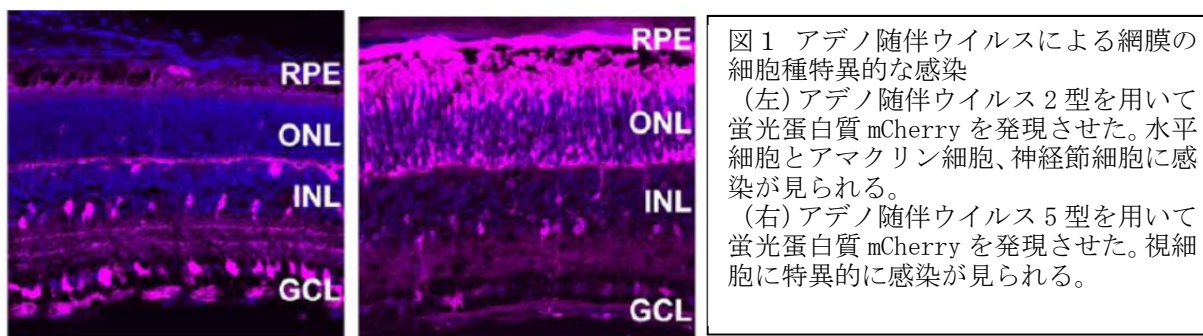
(2) 研究の目的および内容

近年、軸索伸長の誘引あるいは反発のメカニズムは比較的解明されてきたが、特異的なシナプス結合のメカニズムはまだよく分かっていない。中枢神経系の神経細胞やシナプスの多様さを考えると、シナプスの形成発達誘導因子がまだ多く存在することが予想される。本研究では、網膜を用いてシナプスの形成発達に関係する因子(シナプスオーガナイザー)を同定し、その機能メカニズムを分子、細胞、個体レベルで解析することにより、特異的なシナプス形成発達機構の解明を目指す。

(3) 本年度の研究実施項目・概要

アデノ随伴ウイルスベクターを用いた発生期網膜における細胞タイプ特異的な遺伝子発現技術の確立

網膜には、大きく分類して 5 種の神経細胞が存在するが、シナプス形成発達誘導因子の研究を進めるために、それぞれの細胞に特異性を持たせた発現実験を行うことができれば、より生体機能を反映した精度の高い実験を行うことが可能になる。アデノ随伴ウイルス (AAV) は、感染細胞にほとんど毒性がなく、分化した神経細胞に高効率で導入が可能であり、ゲノムに組み込まれることもないため、遺伝子発現のベクターとして優れている。さらに、shRNA を組み込んで、特定の細胞でノックダウン実験を行うことができ、時間をかけずに遺伝子機能を解析することが可能である。アデノ随伴ウイルスには多くの感染特異性の異なる型(serotype)が存在するが、発達期の網膜での細胞感染特異性ははっきりとわかっていなかった。私たちは、マウス発達期網膜において感染効率のよいアデノ随伴ウイルスの選定を行った<sup>1)</sup>。アデノ随伴ウイルスベクター 1, 2, 5, 8, 9, 10, 11 型のそれぞれに蛍光蛋白質 mCherry 遺伝子を組み込み、発達期マウス網膜において感染実験を行っ



た。実験の結果、アデノ随伴ウイルス 5 型は視細胞への感染特異性が高く、一方、水平細胞、アマクリン細胞、ガングリオン細胞への感染は 2 型と 8 型の特異性が高かった。この手法を用いてシナプス形成因子を特定の細胞において発現あるいはノックダウンさせることによって、シナプス形成因子の機能解析に役立てることができると期待される。

また、私達の確立した重篤な網膜色素変性症のモデルである Crx 欠損マウスの網膜に正常な Crx を発現するアデノ随伴ウイルスを注入することにより、視細胞の遺伝子発現や、網膜電図 (ERG)、網膜組織像の改善が見られることを見いだした。私達の作製した Crx プロモーターを用いたアデノ随伴ウイルスベクターは、発達期ならびに成体の視細胞特異的に発現を誘導することが可能であり、遺伝子治療モデル実験においても、効率よく機能することが本研究で実証された。この結果から、ヒト網膜変性症においてもアデノ随伴ウイルスを用いた遺伝子治療が有効であることが期待される。この研究成果は、平成 25 年 1 月 16 日の毎日新聞や NHK ニュースなどで報道された。

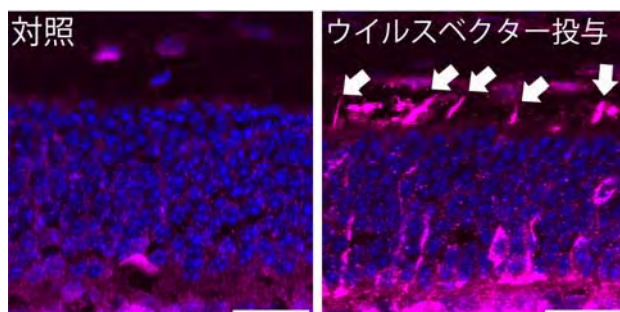


図 2 Crx 欠損マウスにおける網膜視細胞の発生・形態形成異常の回復  
網膜視細胞のマーカー蛋白質を蛍光標識した。対照 (ウイルスベクターを投与していない) の Crx 欠損マウスでは、マーカー蛋白質の発現が全く認められなかった。一方、ウイルスベクター投与マウス (ウイルスベクターで Crx を補った Crx 欠損マウス) では、マーカー蛋白質の発現の回復が認められ、さらに、網膜視細胞がもつ特有の構造で、光の感受に必要な外節の構造の回復が観察された (矢印の部分)。



図 3 Crx 欠損マウスにおける網膜生理機能の回復  
網膜電図という手法で網膜の光への応答性を調べた。対照の Crx 欠損マウスでは、全く光への応答が認められなかった。一方、ウイルスベクター投与マウスでは、網膜の光への応答を示す波形が検出され、網膜生理機能の回復が認められた。

### 立花グループ

(1) 研究題目: 網膜神経回路の電気生理学的解析

(2) 研究の目的および内容

網膜神経回路の機能分化を明らかにするために、野生型および変異マウス・ラットやキンギョの網膜に平面型マルチ電極法およびホールセル・クランプ法を適用してシナプス伝達特性および光応答を電気生理学的に解析する。

(3) 本年度の研究実施項目・概要

動きを検出する神経節細胞には、方向選択性を示す ON 型と ON-OFF 型の 2 種類がこれまでに報告されている。ON 型の方向選択性を示す神経節細胞に入力を送っていると思われるアマクリ

ン細胞に関して、細胞形態と電気的特性に関する解析を行った。また、神経節細胞の樹状突起の張り方と受容野中心部との関係を詳細に検討し、動くバー刺激とフラッシュ・バー刺激に対するスパイク発火潜時を解析した。第2次ニューロンである双極細胞の軸索終末部には2種類のGABA作動性入力があり、その動作特性を解析し、視覚情報処理における機能的意義を検討した。

### 3-1) 動きを検出する神経回路網の解析

哺乳類網膜のON型運動方向選択性神経節細胞における方向選択性に関しては、シナプス前細胞であるアマクリン細胞のサブタイプが未だ同定されていない。そこで、柳川右千夫教授の作成したVGAT-Venusラットを用いて、蛍光標識されたGABA作動性アマクリン細胞から光応答を記録し、neurobiotinで免疫染色して細胞形態を観察し、サブタイプを分類した。ON型運動方向選択性神経節細胞が樹状突起を伸ばしている内網状層のb層でシナプス結合する可能性の高い異所性アマクリン細胞(細胞体が神経節細胞層に存在)に着目して解析した結果、アマクリン細胞(原義:“無軸索”細胞)であるにもかかわらず、脱分極するとNaスパイクを発生するサブタイプは複数の分岐した軸索を持ち、Naスパイクを発生しないサブタイプは軸索をもたないことが明らかとなった。Perry and Walker (1980)はラット網膜の異所性アマクリン細胞には6つのサブタイプに分かれるとしていたが、本研究から、細胞形態と電気的特性から少なくとも8つに分かれることが明らかになった。ON型運動方向選択性神経節細胞と

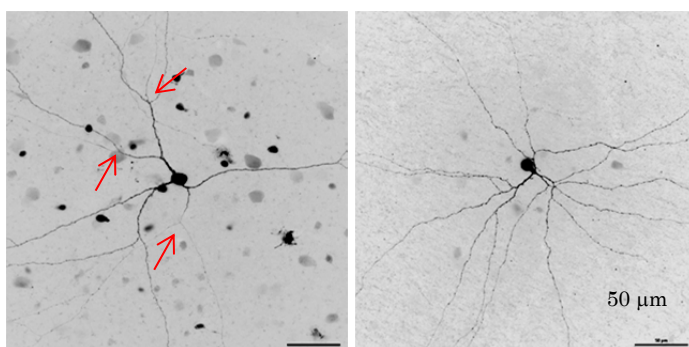


図4 軸索(矢印)を持つ異所性アマクリン細胞(左)と軸索を持たない異所性アマクリン細胞(右)の例。ホールセル・クランプ法で膜特性を調べた後、neurobiotinを細胞内に注入し、免疫組織化学的に処理して共焦点顕微鏡で形態を観察した。脱分極刺激に対してNaスパイクを発生したのは軸索を持つサブタイプ(左)のみであった。

シナプス結合する異所性

アマクリン細胞のサブタイプを絞り込むことができたので、現在、神経節細胞と異所性アマクリン細胞からの同時記録を行い、動きを検出する神経回路網の解析を行っている。

神経節細胞の多くは中心一周辺拮抗型の同心円状受容野を持つ。このような受容野の形状は、小さなスポット光の位置を変えて照射したり、細胞体を中心としてスポット光のサイズを変えて照射したりしたときの、スパイク発火頻度から求められてきた。一方、樹状突起の張り方は必ずしも細胞体から等距離に伸びるような円形状ではなく、細長い形状や片流れの形状をしている。そこで、キンギョの剥離網膜標本を用いて、神経節細胞の受容野中心部のサイズ(スパイク発火頻度が最大となるスポットサイズ:興奮性応答が空間加重される領域)と樹状突起の張り方との関係を詳細に解析した。その結果、受容野中心部のサイズは、樹状突起の先端が形作る多角形のフェレ径(射影径)を考慮して円形近似するとほぼ一致することがわかった。また、スポット光刺激ではなくバー刺

激を提示してスパイクの発火タイミングを調べると、動くバー刺激の方が静止したフラッシュ・バー刺激よりも早くスパイクを発生させることがわかった。これは、動きの予測やフラッシュ・ラグ錯視として知られている知覚現象が、既に網膜神経節細胞レベルで始まっていることを示唆している。

### 3-2) 双極細胞への抑制性入力機能解析

網膜内網状層において、双極細胞の軸索終末部は、アマクリン細胞から相反抑制 (**reciprocal inhibition**) と側抑制 (**lateral inhibition**) という2種類の GABA 作動性の抑制性入力を受け取る。しかし、これらがどのような光刺激条件で作動し、視覚情報処理に影響を与えるのかについては不明であった。そこで、相反抑制と側抑制を駆動する機構の特性をキンギョ網膜のスライス標本を用いて検討した<sup>4)</sup>。その結果、相反抑制は、双極細胞の軸索終末部で  $Ca^{2+}$  電流が活性化されてグルタミン酸が放出されると、直ちに  $Ca^{2+}$  電流を打ち消すように作動することが明らかとなった。一方、側抑制は、単一の双極細胞からのグルタミン酸作動性出力では作動せず、外網状層の双極細胞樹状突起間に存在するギャップ結合 (Arai et al., 2010) を介して複数の双極細胞が興奮することによって作動することが明らかとなった。相反抑制と側抑制では  $GABA_A$  受容体と  $GABA_C$  受容体の構成比や阻害剤に対する感受性が異なっており、また、電位依存性  $Na^+$  チャンネルの分布が異なっていた。したがって、局所抑制と側抑制は、それぞれ異なるシナプス(おそらく、異なるアマクリン細胞)の活性化によって作動することが示唆された(下図)。局所抑制と側抑制が光刺激によって駆動される条件を調べた結果、広い面積の光照射では弱い光強度で側抑制が作動すること、また、局所的な強い光照射では局所抑制のみが作動することがわかり、両者は光刺激の特性に応じて独立して作動することが明らかになった。ギャップ結合で電氣的に繋がれた双極細胞の2次元配列モデルを構築してコンピュータ・シミュレーションを行った結果、局所抑制と側抑制は、視覚情報の信号/雑音比をほとんど落とさずに双極細胞の出力を減少させ、シナプス後細胞への効率的な視覚信号の伝達に寄与していることが示された。

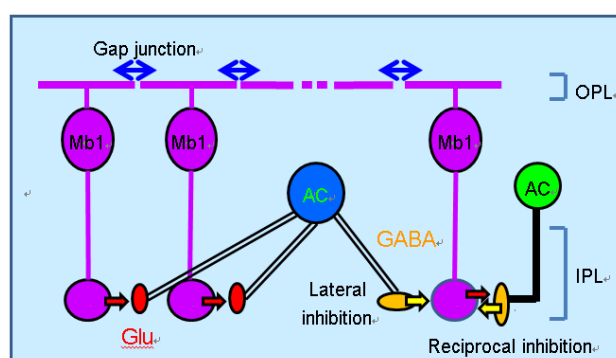


図5 キンギョ網膜の Mb1 型双極細胞 (Mb1) は、外網状層 (OPL) で樹状突起間にギャップ結合 (Gap junction) を形成している。Mb1 は脱分極すると内網状層 (IPL) にある軸索終末部からグルタミン酸 (Glu) を放出する。この軸索終末部には GABA 作動性アマクリン細胞 (AC) から2種類の抑制入力がある。相反抑制 (Reciprocal inhibition) は、単一の Mb1 が脱分極することによって作動することができるが、側抑制 (Lateral inhibition) は複数の Mb1 が脱分極しないと作動することができない。

### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### ● 論文詳細情報

1. Omori Y, Araki F, Chaya T, Kajimura N, Irie S, Terada K, Muranishi Y, Tsujii T, Ueno S, Koyasu T, Tamaki Y, Kondo M, Amano Sh Furukawa T (2012) Presynaptic dystroglycan-pikachurin complex regulates the proper synaptic connection between retinal photoreceptor and bipolar cells. *J Neurosci* 32: 6126-6137. (doi:10.1523/JNEUROSCI.0322-12.2012.)
2. Peachey NS, Pearing JN, Bojang P, Jr, Hirschtritt ME, Sturgill-Short G, Ray TA, Furukawa T, Koike C, Goldberg AF, Shen Y, McCall MA, Nawy S, Nishina PM, Gregg RG (2012) Depolarizing Bipolar Cell Dysfunction due to a Trpm1 Point Mutation. *J Neurophysiol* 108:2442-2451. (doi:10.1152/jn.00137.2012)
3. Watanabe S, Sanuki R, Ueno S, Koyasu T, Hasegawa T, Furukawa T (2013) Tropisms of AAV for subretinal delivery to the neonatal mouse retina and its application for in vivo rescue of developmental photoreceptor disorders. *PLoS One* 8:e54146. (doi: 10.1371/journal.pone.0054146)